

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 754 715

②1 N° d'enregistrement national : 96 12718

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : A 61 K 39/002, A 61 K 39/02, 39/12, 33/08, 31/19,  
33/42, 31/23, 31/135, 9/113

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.10.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 24.04.98 Bulletin 98/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION DE  
PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES  
SEPPIC SOCIÉTÉ ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GANNE VINCENT et AUCOUTURIER  
JEROME.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : L'AIR LIQUIDE SOCIÉTÉ ANONYME  
POUR L'ÉTUDE ET L'EXPLOITATION DES  
PROCÉDÉS GEORGES CLAUDE.

⑤4 ADJUVANT, NOTAMMENT SOUS FORME D'UNE EMULSION CONTENANT UN CATION MÉTALLIQUE  
TRIVALENT ET COMPOSITION VACCINALE LE COMPRENANT.

⑤7 Composition comprenant:

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur in  
vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides  
aminés; et,

(ii) au moins un adjuvant, caractérisée en ce que ledit ad-  
juvant contient au moins un composé sympathomimétique.  
Et leur utilisation comme médicament.

US Eq  
6,117,432  
No EOs  
No Cs

FR 2 754 715 - A1



La présente invention concerne de nouveaux adjuvants pour compositions vaccinales ainsi que des compositions comprenant au moins un antigène, notamment un antigène d'origine virale, bactérienne ou parasitaire et  
5 au moins un adjuvant.

L'utilisation d'adjuvants dans les compositions est connue depuis longtemps. Ces adjuvants ont pour objet principal de permettre l'augmentation de la réponse immunitaire. Ces adjuvants sont de natures diverses. Ils peuvent par exemple consister en des liposomes, des émulsions comprenant au moins  
10 une phase huile et au moins une phase aqueuse, du type adjuvants de Freund ou, de manière plus courante en des sels minéraux insolubles dans l'eau. Ces sels minéraux peuvent constituer par exemple en l'hydroxyde d'aluminium une nitrate de cérium, le sulfate de zinc, l'hydroxyde de fer colloïdal ou le chlorure de calcium. L'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant le plus couramment  
15 utilisé. Ces adjuvants sont décrits notamment dans l'article de Rajesh K. Gupta et al "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vaccine, vol. 11, Issue 3, 1993, pages 993-306.

Les adjuvants mentionnés ci-dessus présentent l'inconvénient d'une efficacité faible. En outre, il est connu que l'hydroxyde d'aluminium n'induit  
20 efficacement qu'une immunité humorale, et non une immunité cellulaire. Par ailleurs, ils peuvent induire une certaine toxicité vis-à-vis des sujets traités. Plus particulièrement, lorsque ces compositions thérapeutiques sont injectées, on observe la formation de lésions et d'autres réactions locales telles que des granulomes au niveau du point d'injection.

25 Un premier objet de l'invention consiste en des compositions thérapeutiques comprenant un adjuvant permettant une augmentation de la réponse immune supérieure à celle conférée par l'hydroxyde d'aluminium, sans engendrer de lésions ou de réactions locales du type granulomes.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition thérapeutique comprenant un adjuvant induisant efficacement aussi bien une immunité cellulaire qu'une immunité humorale.

L'invention a pour objet une composition comprenant :

5 (i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés ; et,

(ii) au moins un adjuvant,

caractérisée en ce que ledit adjuvant contient au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau constitué d'un anion  
10 organique ou d'un cation métallique trivalent.

Par antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, on désigne soit des micro-organismes tués, tels que les virus, les bactéries ou les parasites, soit des fractions purifiées de ces micro-organismes, soit des micro-organismes vivants  
15 dont le pouvoir pathogène a été atténué ; on peut citer notamment un virus recombinant notamment un virus non enveloppé tel que les adénovirus, le virus de la vaccine, le virus Canarypox, les herpès virus, les baculovirus ; on désigne aussi un vecteur recombinant viral non enveloppé vivant dont le génome contient, insérée de préférence dans une partie non essentielle pour la  
20 réplication du virus enveloppé correspondant, une séquence codant pour une sous-unité antigénique induisant une synthèse d'anticorps et/ou un effet protecteur contre le susdit virus enveloppé ou micro-organisme pathogène ; ces sous-unités antigéniques peuvent être par exemple, une protéine, une glycoprotéine, un peptide, ou une fraction peptidique et/ou protectrice contre  
25 une infection par un micro-organisme vivant tel un virus enveloppé, une bactérie ou un parasite.

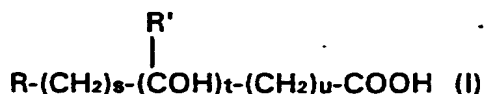
On peut citer notamment un plasmide recombinant constitué d'une séquence de nucléotide dans laquelle est insérée une séquence nucléotidique exogène, provenant d'un micro-organisme ou d'un virus pathogène. Cette  
30 dernière séquence nucléotidique a pour but de permettre l'expression d'un

composé comprenant une séquence d'acides aminés, ce composé ayant lui-même pour but de déclencher une réaction immune dans un organisme hôte ;

Un sel soluble dans l'eau au sens de la présente invention peut être tel que sa solubilité dans l'eau est supérieure ou égale à 10 g/l et, de préférence, comprise entre 10 et 2000 g/l. Le cation métallique trivalent constitutif dudit sel pharmaceutiquement acceptable est de préférence le cation trivalent de l'aluminium  $Al^{+++}$ . Il a en effet été constaté que ce sel pharmaceutiquement acceptable est soluble dans l'eau et permet l'induction d'une réponse immune particulièrement importante tout en présentant une toxicité faible. L'anion organique constitutif dudit sel pharmaceutiquement acceptable est avantageusement un anion d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné de préférence un groupe phosphorique ou un groupe carboxylique. L'acide glycérophosphorique est un anion à groupe phosphorique préféré. Les anions comprenant au moins un groupe carboxylique préféré sont dérivés de composés choisis parmi :

les oses acides de préférence des oses acides ayant de 5 à 7 atomes de carbone, plus préférentiellement ceux ayant 6 à 7 atomes de carbone, les acides mono ou polycarboxyliques, les acides aminés.

Les acides mono ou polycarboxyliques préférés sont l'acide fumarique, l'acide salicylique ou les composés de formule (I)



où R représente  $COOH$ ,  $CH_3CO$ ,  $CH_3$  ou  $CH_2OH$ ,

$R'$  représente H ou  $COOH$

et s, t et u, identiques ou différents sont compris entre 0 et 3.

Des composés de formule (I) préférés sont l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide pyruvique.

Au sens de la présente invention, un ose acide consiste en un ose comprenant au moins une fonction carboxylique, un ose étant un glucide

constitué par les sucres réducteurs. Ces oses acides sont avantageusement des dérivés d'aldoses, obtenus par oxydation de la fonction alcool primaire ou de la fonction aldéhydique en fonction carboxylique. De tels composés peuvent tout particulièrement consister en l'acide gluconique, l'acide glucuronique, l'acide fructoheptonique, l'acide gluconoheptonique, l'acide glucoheptonique. Lorsque l'anion organique est un dérivé d'un acide aminé, cet acide aminé peut être un acide  $\alpha$ -aminé tel que l'acide glutamique, la méthionine et, tout particulièrement, l'acide aspartique.

Une composition ainsi définie contient entre 0,02 et 3000 mg/ml, de préférence 0, 1 et 1000 mg/ml du sel pharmaceutiquement acceptable et, notamment, entre 0,1 et 150 mg/ml.

L'invention a notamment pour objet la composition telle que définie précédemment dans laquelle l'adjuvant comprend le salicylate d'aluminium ou l'acétate d'aluminium soluble.

Dans une première variante de l'invention, la composition telle que définie ci-dessus peut également contenir une huile. Dans un tel cas, la composition selon l'invention se présente avantageusement sous la forme d'une émulsion associant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile. Cette émulsion peut être du type huile dans eau (H/E), eau dans huile (E/H), eau dans huile dans eau (E/H/E) ou microémulsion. On préfère cependant les émulsions E/H/E et H/E. Une telle émulsion peut être préparée selon les méthodes classiques de préparation d'une émulsion, notamment selon les procédés décrits dans les demandes de brevet EP-A-489 181 et EP-A-481 982. Ainsi, on peut émulsionner sous agitation l'huile constitutive de la phase huile avec la phase aqueuse constituée d'une solution ou d'une suspension aqueuse contenant l'antigène.

Une émulsion selon l'invention peut comporter, en poids, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, de préférence, de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse. L'émulsion doit être stable de préférence pendant au moins 12 mois quand elle est stockée à 4°C.

Les huiles, constituées de ladite phase huileuse pouvant être utilisées dans la composition selon l'invention sont avantageusement des huiles fluides choisies parmi les huiles minérales naturelles ou synthétiques, ou les huiles non minérales d'origine végétale, animale ou synthétique connues pour leur absence ou leur faible toxicité.

Elles doivent être liquides à la température de stockage (+4°C) ou au moins donner des émulsions liquides à cette température. On choisira en particulier des huiles minérales à chaîne linéaire ayant un nombre d'atomes de carbone de préférence supérieur à 16 et exempt de composés aromatiques.

Des exemples connus sont le MARCOL 52 et le DRAKEOL 6VR. On peut également utiliser des huiles synthétiques telles que les polyisobutènes ou les polyisoprènes. Parmi les huiles végétales, on choisira les huiles insaturées riches en acide oléique qui sont biodégradables, par exemple les huiles d'arachide, d'olive, de sésame, de soja ou de germes de blé. Pour les huiles animales, les mêmes critères de tolérance et d'efficacité immunitaire sont requises. A titre d'exemple comme huiles animales, on peut citer le squalane ou l'huile de spermaceti. A titre d'huile non minérale synthétique, on peut encore citer les esters d'alcools et d'acides gras tels que, par exemple, l'oléate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, les mono di ou triglycérides, les esters de propylène glycol, les glycérides partiels, tels que les glycérides d'huile de maïs comme ceux commercialisés sous le nom de LANOL par la Société SEPPIC, la maïsine, ou l'oléate d'oléyle. Par ailleurs, la composition selon l'invention quand elle se présente sous forme d'une émulsion telle que définie plus haut, peut également avantageusement comporter un ou plusieurs agents tensioactifs émulseurs. Ce dernier présente un caractère lipophile ou hydrophile caractérisé par une valeur HLB (hydrophile-lipophile-balance) comprise entre 1 et 19.

Un tel tensioactif peut consister en

- un alkylpolyglycoside ou un mélange d'alkylpolyglycosides de formule  $R_n-(O)-Zn$  où  $R_n$  représente un radical aliphatique saturé, linéaire ou ramifié,

comprenant de 4 à 24 atomes de carbone, Z est le reste d'un sucre, de préférence le glucose et n est compris entre 1 et 5 de préférence entre 1,1 et 2,

- les saponines,
- 5       - les lécithines,
- les alcanols polyoxyéthylés, tels que ceux commercialisés sous la désignation BRIJ par la société ICI,
- les polymères comprenant des blocs polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes, tels que ceux commercialisés sous la désignation
- 10   PLURONICS par la société BASF.

Des tensioactifs particulièrement préférés sont les esters de polyéthylèneglycol, obtenus par condensation d'un acide gras, notamment un acide gras liquide à 20°C avec un polyéthylèneglycol de poids moléculaire compris entre 80 et 200 ; un tel tensioactif est commercialisé par la Société

15   SEPPIC sous la marque SIMULSOL 2599.

Un autre agent tensioactif préféré dans le cadre de la présente invention consiste en un ester obtenu par condensation d'un acide gras, avantageusement un acide gras liquide à 20°C avec un sucre, le sorbitol ou du glycérol. Ledit sucre peut consister en glucose, saccharose ou, de

20   préférence, mannitol. A titre d'ester de mannitol particulièrement préféré, on peut citer des oléates de mannitol obtenus par anhydrisation de la chaîne carbonée polyhydroxylée du mannitol qui se cyclise en 1-4 ou en 2-6.

Des dérivés de ces esters de sucre de polyéthylèneglycol, de sorbitol ou de glycérol peuvent être également mis en oeuvre. Ces dérivés présentent une

25   hydrophilie modifiée notamment par greffage de fonctions hydrophiles telles que alcool, polyol, oxyde d'éthylène, oxyde de propylène, acide carboxylique, amine ou amide. De tels dérivés peuvent par exemple consister en des esters gras de sorbitanne polyoxyéthylés, tels le TWEEN.

Les autres types de tensioactifs préférés consistent en des huiles

30   végétales éthoxylés, telles que, par exemple l'huile de ricin polyéthoxylée,

cette huile étant hydrogénée ou non, ou des esters de polyglycerol, notamment des esters de polyglycérol d'acides gras naturels tels que l'acide oléique, l'acide stéarique, l'acide ricinoléique ou l'acide isostéarique et, particulièrement, des ricinoléates ou des polyricinoléates de polyglycérol.

5        Un agent tensioactif selon l'invention est de préférence pharmaceutiquement acceptable au niveau des muqueuses ; il doit notamment être dépourvu de métaux lourds et présenter des indices d'acides ou de peroxydes très faibles. Il est également souhaitable qu'il satisfasse les normes de tests d'innocuité tels que par exemple, ceux décrits par S.S. Berlin,  
10    Annales of Allergy, 1962, 20, 473 ou les tests de toxicité anormale décrits dans la pharmacopée européenne. Préférentiellement, l'agent tensioactif est associé à l'adjuvant huileux avant formation de l'émulsion.

La concentration en agent tensioactif dans la composition telle que définie précédemment peut être comprise entre 0,01 et 500 mg/ml, et, de  
15    préférence, entre 0,1 et 200 mg/ml.

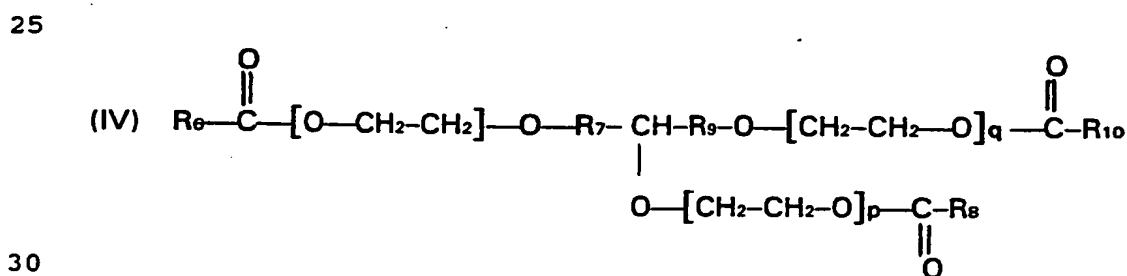
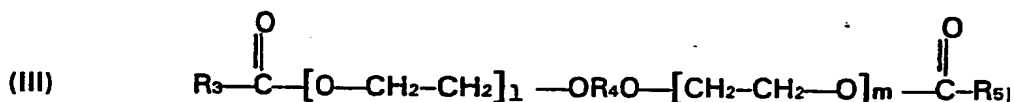
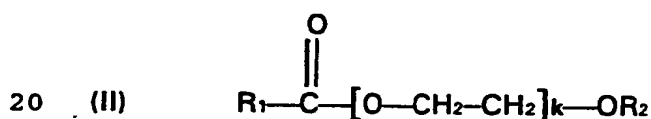
Des huiles associées avec un agent tensioactif (ester de mannitol) convenant tout particulièrement dans le cadre de la présente invention sont celles commercialisées par la Société SEPPIC sous la marque MONTANIDE. La nature de ces huiles, le type d'émulsion qu'elles permettent d'obtenir et les  
20    caractéristiques (viscosité et conductivité) de ces émulsions sont décrites dans la demande internationale WO94/16681, publiée le 4 août 1994 et, notamment, page 11, tableau I. Ces compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour le traitement des maladies humaines ou vétérinaires. Elles permettent notamment de soulager les maladies infectieuses avec agent  
25    intracellulaire, notamment les maladies respiratoires, les maladies infectieuses opportunistes et dans le cadre de la médecine vétérinaire les maladies infectieuses des poissons.

La composition selon l'invention peut contenir aussi des substances modulatrices de l'immunité.



L'adjuvant huileux peut encore consister en une huile auto-émulsionnable, c'est-à-dire une préparation huileuse capable de former une émulsion stable avec une phase aqueuse, pratiquement sans apport d'énergie, par exemple par dispersion dans la phase aqueuse par agitation mécanique lente. A ce titre, on peut citer des huiles auto-émulsionnables telles connues dans la pharmacopée européenne sous les désignations Labrafil et Simulsol. Ces huiles sont des glycérides polyglycosés.

Des huiles auto-émulsionnables préférées sont celles décrites dans la demande de brevet français N° 9500497 déposée le 18 Janvier 1995, au nom de la Demanderesse, intitulée "utilisation d'esters d'acides gras éthoxylés comme composants auto-émulsionnables notamment utiles pour la préparation de compositions phytosanitaires ou de médicaments à usage vétérinaire ou humain", dont référence est intégrée à la présente description. Ces huiles consistent en des esters d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles :

- R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

5 - R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> et R<sub>9</sub> représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k, l+m, n+p+q étant un nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre  
10 environ 5 et environ 9.

R<sub>1</sub> est de préférence choisi parmi les restes des acides palmitique, stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique et linolénique et R<sub>2</sub> représente un radical méthyle et k est un nombre entier compris entre 1 et 5, de préférence égal à 2, et par ailleurs, les esters d'acides gras éthoxylés de formule III  
15 préférés sont ceux où :

(i) - R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> représentent des chaînes hydrocarbonées ayant de 16 à 22 atomes de carbone correspondant notamment aux chaînes grasses de l'huile de colza, de maïs, de soja, d'arachide et de noyaux d'abricots ;

- R<sub>7</sub> et R<sub>9</sub> représentent un groupe méthylène CH<sub>2</sub> ;

20 - n, p, q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 3 et 30, et de préférence égale à 20 ; ou

(ii) - R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> représentent des chaînes hydrocarbonées correspondant aux chaînes grasses de l'huile de ricin ;

- R<sub>7</sub> et R<sub>9</sub> représentent un radical méthylène CH<sub>2</sub> ;

25 - n, p, q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 5 et 7.

La concentration en huile auto-émulsionnable dans la composition selon l'invention peut être comprise entre environ 5 et 700 g/l, de préférence entre environ 10 et 500 g/l.

Outre la phase huile et la phase aqueuse, la composition selon l'invention peut comporter un agent stimulant immunitaire conventionnel tel l'Avridine®, soit la N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyéthyl) propane-diamine, les dérivés du MDP (muramyl dipeptide) notamment le threonyl-MDP, les  
5 dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du Lipide A.

La composition selon l'invention peut comprendre encore un ou plusieurs agents tensioactifs, en l'absence de tout adjuvant huileux.

La composition se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. Celle-ci peut être préparée par simple mélange de l'agent tensioactif  
10 avec une dispersion dans l'eau de l'antigène ou du générateur d'antigène in vivo.

L'agent tensioactif peut être choisi parmi les agents tensioactifs décrits plus haut, en association avec un adjuvant huileux.

Ladite solution micellaire peut comporter de 0,5 à 500 mg/ml, de  
15 préférence de 1 à 250 mg/ml en agent tensioactif.

Une composition selon l'invention peut aussi comporter un composé sympathomimétrique.

Par composés sympathomimétiques, on désigne notamment les amphétamines, les catécholamines, les phénylisopropylamines ou la tyramine.  
20 Comme exemples de tels composés, on peut citer notamment l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol.

Une composition selon la présente invention peut comprendre un antigène tel qu'un virus, un micro-organisme, plus particulièrement une  
25 bactérie ou un parasite, ou un composé comprenant une chaîne peptidique. Un tel composé peut consister une protéine ou une glycoprotéine, notamment une protéine ou une glycoprotéine issues d'un micro-organisme, un peptide synthétique ou une protéine ou un peptide issu du génie génétique. Lesdits virus et micro-organisme peuvent être totalement inactivés ou vivants  
30 atténués. A titre de virus pouvant constituer un antigène selon la présente

invention, on peut citer le virus de la rage, les herpès virus tels que le virus de la maladie d'Aujeszky, les orthomixovirus tels que Influenzae, les picornavirus tels que le virus de la fièvre aphteuse ou les rétrovirus tels que les VIH. A titre de micro-organisme du type bactérien pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer E. coli, et ceux des genres Pasteurella, Furunculosis, Vibriosis, Staphylococcus et Streptococcus. A titre de parasite, on peut citer ceux des genres Trypanosoma, Plasmodium et Leishmania.

Une composition selon l'invention comprend une concentration en antigène qui dépend de la nature de cet antigène et de la nature du sujet traité. Il est toutefois particulièrement remarquable qu'un adjuvant selon l'invention, associé ou non à un adjuvant huileux et/ou un agent tensioactif tels que définis plus haut, permet de diminuer d'une façon notable la dose habituelle d'antigène requise. La concentration adéquate d'antigène peut être déterminée de manière classique par l'homme du métier. Généralement, cette dose est de l'ordre de 0,1µg/ml à 1g/ml plus généralement comprise entre 1 µg/ml et 100mg/ml.

Une composition selon l'invention peut aussi comprendre un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, c'est-à-dire un composé biologique capable d'exprimer un tel composé dans l'organisme hôte dans lequel on a introduit ledit générateur in vivo. Le composé comprenant la séquence d'acides aminés, peut être une protéine, un peptide ou une glycoprotéine.

Ces générateurs in vivo sont généralement obtenus par des procédés issus du génie génétique.

Plus particulièrement, ils peuvent consister en des micro-organismes vivants, généralement un virus, jouant le rôle de vecteur recombinant, dans lequel est insérée une séquence nucléotidique, notamment un gène exogène. Ces composés sont connus en tant que tels et utilisés notamment comme vaccin sous unitaire recombinant.

A cet égard, on peut se référer à l'Article de M. ELOIT et al., Journal of virology (1990) 71, 2925-2431 dans la demande internationale WO-A-91/00107 ou à la demande internationale WO-A-94/16681.

Avantageusement, le micro-organisme constitutif d'un vaccin sous-unitaire recombinant est un virus recombinant non enveloppé, par exemple choisi parmi les adénovirus, le virus de la vaccine, le canarypox virus, les herpès virus ou les baculovirus. Le gène exogène inséré dans le micro-organisme peut être, par exemple, issu d'un virus Aujeszky ou HIV.

Les générateurs in vivo selon l'invention peuvent aussi consister en un plasmide recombinant comprenant une séquence nucléotidique exogène, capable d'exprimer dans un organisme hôte un composé comprenant une séquence d'acides aminés. De tels plasmides recombinants et leur mode d'administration dans un organisme hôte ont été décrits en 1990, par LIN et al., Circulation 82:2217,2221 ; COX et al., J. of VIROL, Sept. 1993, 67, 9, 5664-5667 et dans la demande internationale WO/FR 95/00345 du 21 Mars 1995, au nom de la Demanderesse, intitulée "Une composition comprenant un plasmide recombinant et ses utilisations comme vaccin et médicament".

Selon la nature de la séquence nucléotidique comprise dans le générateur in vivo, le composé comprenant la séquence d'acides aminés qui est exprimé au sein de l'organisme hôte, peut :

(i) être un antigène, et permettre le déclenchement d'une réaction immune,

(ii) avoir une action curative vis-à-vis d'une maladie essentiellement une maladie d'ordre fonctionnel, qui s'est déclenchée chez l'organisme hôte.

Dans ce cas, le générateur in vivo permet un traitement de l'hôte, du type thérapie génique.

A titre d'exemple, une telle action curative peut consister en une synthèse par le générateur in vivo de cytokine, comme les interleukines, notamment l'interleukine 2. Celles-ci permettent le déclenchement ou le

renforcement d'une réaction immune visant à l'élimination sélective des cellules cancéreuses.

La concentration en ledit générateur in vivo dans la composition selon l'invention dépend, là encore, notamment de la nature dudit générateur et de l'hôte dans lequel il est administré. Cette concentration peut être aisément déterminée par l'homme du métier, sur la base d'expérience de routine.

A titre indicatif, on peut toutefois préciser que lorsque le générateur in vivo est un microorganisme recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre  $10^2$  et  $10^{15}$  micro-organismes/ml, de préférence entre  $10^5$  et  $10^{12}$  micro-organismes/ml.

Lorsque le générateur in vivo est un plasmide recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre 0,01 et 100 g/l.

Une composition selon l'invention peut être utilisée comme médicament préventif ou curatif. Selon la nature de l'antigène ou du générateur in vivo, une composition selon l'invention peut être administrée à des poissons, des crustacés tels que les crevettes, des volailles, notamment, des oies, des dindes, des pigeons et des poulets, aux canidés tels le chien, aux félidés tels le chat, aux porcs, aux primates, aux bovidés, aux ovidés et aux chevaux, pour traiter par exemple la toxoplasmose ovine ou le pou du saumon. La composition selon l'invention peut être également administrée à l'homme. L'administration de la composition peut se faire de manière classique par voie parentérale, notamment par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale ou par voie mucosale notamment par voie orale, voie rectale, voie nasale, voie vaginale.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation d'un adjuvant tel que défini ci-dessus pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie infectieuse, notamment une maladie infectieuse engendrée par un virus ou un micro-organisme tels ceux mentionnés plus haut.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation de cet adjuvant pour la préparation d'une composition destinée à soigner une maladie d'ordre fonctionnel, telle le cancer ou la mucoviscidose.

5 Dans l'une ou l'autre de ces utilisations, ledit adjuvant peut être associé à un adjuvant huileux, un agent tensioactif ou à un adjuvant huileux lui-même associé à un agent tensioactif, ces adjuvants huileux et tensioactifs étant tels que définis plus haut.

Des compositions adjuvantes comprenant ledit sel pharmaceutiquement acceptable et l'adjuvant huileux et/ou les tensioactifs  
10 précités et, éventuellement, ledit composé sympathomimétique constituent encore un autre aspect de l'invention. Le cas échéant, ces compositions adjuvantes comprennent une phase aqueuse.

Dans ce dernier cas, les compositions adjuvantes selon l'invention, comprenant au moins un adjuvant huileux, et, le cas échéant, un tensioactif,  
15 peuvent se présenter sous la forme d'une émulsion. Cette dernière peut être du type E/H, H/E, E/H/E ou microémulsion.

Ces émulsions peuvent comprendre en poids, de 0,5 % à 99,5 % de phase huile pour 99,5 % à 0,5 % de phase aqueuse, de préférence, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, plus préférentiellement,  
20 de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse.

Le cas échéant, elles peuvent comprendre de 0,01 à 500 mg/ml, de préférence de 0,1 à 200 mg/ml d'un tensioactif au moins.

Lorsque la composition adjuvante selon l'invention ne comprend, outre le sel pharmaceutiquement acceptable, le composé sympathomimétique,  
25 et une phase aqueuse, qu'un ou plusieurs tensioactifs, elle se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. La teneur en tensioactif de cette solution micellaire peut être comprise entre 0,01 et 900 mg/ml, de préférence entre 1 et 250 mg/ml.

Une composition adjuvante selon l'invention comprend  
30 habituellement le sel pharmaceutiquement acceptable tel que défini

précédemment à une concentration de 0,02 à 3000 mg/ml, de préférence 0,1 à 1000 mg/ml, plus préférentiellement de 0,1 à 150 mg/ml, le composé sympathomimétique c'est à une concentration de  $10^{-10}$  molaire à  $10^{-2}$  molaire de préférence de  $10^{-7}$  Molaire à  $10^{-5}$  Molaire.

5 Ces compositions adjuvantes sont utiles pour préparer les compositions selon l'invention.

Ces dernières peuvent alors être préparées par simple mélange de la composition adjuvante avec une composition comprenant un antigène ou un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés.

10 Les exemples suivants permet de mettre en évidence les propriétés des compositions selon la présente invention.

#### Exemple 1

On a comparé l'effet immunostimulant de 2 compositions comprenant des sels solubles selon l'invention, acétate d'Aluminium soluble ( $C_2H_5AlO_4$ ) et  
15 le salicylate d'Aluminium, avec celui de sels insolubles, comme l'hydroxyde d'Aluminium, le phosphate d'Aluminium et une forme insoluble d'acétate d'Aluminium ( $C_4H_7AlO_5$ ). Ces compositions thérapeutiques comprennent, à titre d'antigène de la sérum albumine bovine (BSA), Grade V, Sigma.

Ces compositions thérapeutiques (dose/souris) d'un volume de 100  $\mu$ l  
20 mises en oeuvre comprenaient 10 $\mu$ g d'antigène et ont été injectées par voie sous-cutanée.

Les concentrations des sels testés correspondent aux concentrations optimales d'utilisation.



Les résultats ont été obtenus 21 jours après vaccination

Adjuvant	réponse IgG1	réponse IgG2a
-	<1000	<1000
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> AlO <sub>4</sub> (forme soluble)	64000	8000
Salicylate d'Aluminium	48000	6000
AlOH	8000	<1000
C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> AlO <sub>5</sub> (forme insoluble)	<1000	<1000
AlPO <sub>4</sub>	<1000	<1000

Les réponses IgG 1 sont représentatives de la réponse humorale.

5 Les réponses IgG 2a sont représentatives de la réponse cellulaire.

Les réponses humorales et cellulaires obtenues avec un adjuvant selon l'invention sont significativement supérieures à celles obtenues avec un adjuvant conventionnel tel Al(OH)<sub>3</sub>, ou AlPO<sub>4</sub>.

10 D'autre part, on met clairement en évidence l'intérêt d'utiliser des adjuvants solubles dans l'eau par rapport à l'utilisation de forme insoluble dans l'eau.

### Exemple 2

15 On a injecté à différents lots comprenant chacun 5 souris, une composition thérapeutique d'un volume de 1000 µl, comprenant 10 µg d'antigène (BSA), par voie sous-cutanée. On a évalué les réactions locales (lésions et granulomes) 8 jours après injection.

	souris 1	souris 2	souris 3	souris 4	souris 5
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> AlO <sub>4</sub> (forme soluble)	0	0	0	+	0
Salicylate d'Aluminium	0	+	0	0	0
AlOH	++	+++	++	+++	++

Les réactions locales obtenues avec un adjuvant selon l'invention sont significativement inférieures à celles obtenues avec un adjuvant conventionnel tel  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

**REVENDEICATIONS****1. Composition comprenant :**

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés; et,

5

(ii) au moins un adjuvant,

caractérisée en ce que ledit adjuvant contient au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau constitué d'un anion organique et d'un cation métallique trivalent.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le  
10 cation métallique trivalent est le cation  $Al^{+++}$ .

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné tel que de préférence un groupe carboxylique ou un groupe phosphorique.

15

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé choisi parmi l'acide glycérophosphorique, l'acide salicylique, l'acide acétique, l'acide aspartique, l'acide gluconique, l'acide fructoheptonique et l'acide glucoheptonique.

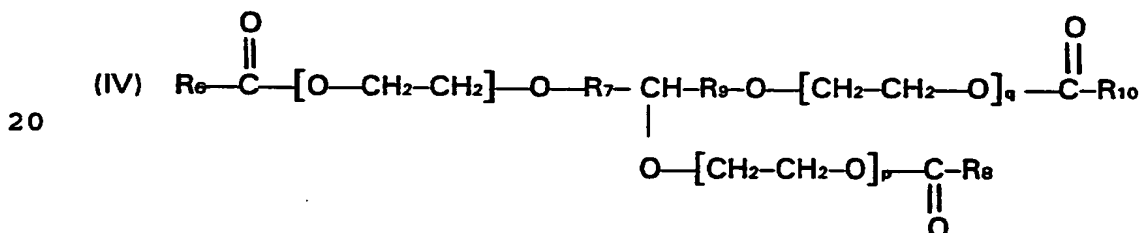
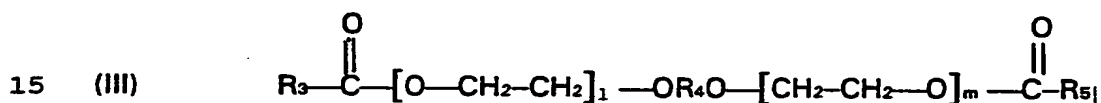
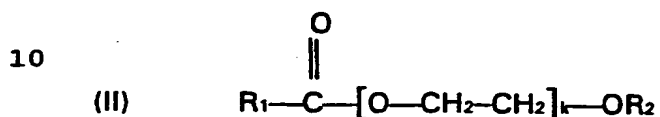
5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le  
20 sel pharmaceutiquement acceptable est le salicylate d'aluminium ou l'acétate d'aluminium solubles.

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une émulsion comprenant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile, la phase huile étant constituée  
25 par un adjuvant, et l'émulsion de préférence du type E/H/E, H/E ou microémulsion.

7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est associé à un agent tensioactif, de préférence un agent tensioactif choisi soit parmi un ester obtenu par condensation d'un acide gras  
30 avec un sucre, un polyéthylèneglycol, le sorbitol ou le glycérol, ou un dérivé

d'un tel ester dont l'hydrophilie a été modifiée, une huile végétale éthoxylée ou leurs mélanges, soit parmi les esters de polyglycérol, notamment un ester de polyglycérol d'acides gras naturels et, de préférence, les ricinoléates ou les polyricinoléates de polyglycérol ou constituant en des huiles de ricin polyéthoxylées hydrogénées ou non.

8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est une huile auto-émulsionnable, notamment un ester d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles :

- R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>10</sub> représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

- R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> et R<sub>9</sub> représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k, l+m, n+p+q étant un nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits

composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre environ 5 et environ 9.

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un agent tensioactif, ladite composition se  
5 présentant sous la forme d'une solution micellaire.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent tensioactif est soit un ester obtenu par condensation d'un acide gras avec un sucre ou du glycérol, ou un dérivé d'un tel ester dont l'hydrophilie a été modifiée ou soit une huile végétale éthoxylée

10 11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, comprenant en outre un stimulant immunitaire tel que l'Avridine®, les dérivés du MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du lipide A.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11 comportant en outre un composé sympathomimétique est choisi parmi les  
15 sympathomimétiques amines telles qu'une catécholamine, une amphétamine, une phénylisopropylamine ou la tyramine et, de préférence, choisi parmi l'éphédrine ou l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol.

13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, pour la mise  
20 en oeuvre d'une méthode de traitement du corps humain ou animal.

14. Médicament selon la revendication 13 destiné à traiter ou à prévenir les maladies infectieuses et/ou fonctionnelles et notamment les maladies engendrées par un virus, un microorganisme ou un parasite telles que les maladies respiratoires.

25 15. Médicament selon la revendication 13 destiné à traiter la maladie d'Aujeszky chez les porcs, la toxoplasmose ovine ainsi que les maladies des poissons tel que le pou du saumon ou les maladies des crustacés.

16. Adjuvant tel que défini à l'une des revendications 6 à 10.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFA 535184  
FR 9612718

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
E	WO 96 32964 A (SEPPIC SA ;GANNE VINCENT (FR)) 24 Octobre 1996 * page 2, ligne 17 - page 13, ligne 34 * ---	3,4,6-17
A,D	WO 95 25542 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR L ;GANNE VINCENT (FR)) 28 Septembre 1995 ---	
A,D	WO 94 16681 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR LE ;GANNE VINCENT (FR)) 4 Août 1994 ---	
A,D	WO 96 22109 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR LE ;TROUVE GERARD (FR)) 25 Juillet 1996 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
4 Juillet 1997		Rempp, G
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>~ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)